

На правах рукописи



Сташевски Зенон

**ТРАНСГЕНЕЗ PVY^{NTN} -СР ГЕНОМ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ У ВИРУСА
КАРТОФЕЛЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВИРУСОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ**

03.00.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена в лаборатории селекции картофеля ГНУ Татарского научно-исследовательского института сельскохозяйственных наук РАСХН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Багаева Татьяна Вадимовна

кандидат биологических наук
Уразов Наиль Гумерович

Ведущая организация: ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита состоится «26» ноября 2009 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И.Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «_____» октября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вирусные болезни растений вызывают большие потери урожая экономически важных сельскохозяйственных культур во всем мире [Росс, 1989; Иванюк с соавт., 2005].

Из 30-и с лишним вирусов, которыми поражаются растения табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., Y-вирус картофеля (YBK) в настоящее время является наиболее экономически значимым. YBK, впервые описанный Смитом в 1931 году [Smith, 1931], до сих пор является наиболее опасным патогеном картофеля. При высадке инфицированных YBK семенных клубней картофеля снижение урожайности культуры составляет от 30 до 85%, а в некоторых случаях достигает 100%, по сравнению с урожайностью свободного от вирусов семенного материала [Шпаар, 2004; Иванюк с соавт., 2005]. YBK^N и другие некротические штаммы этого вируса вызывают системный некроз растений табака, что частично или полностью уничтожит его посадки [Kollar *et al.*, 1993]. Штаммы YBK^{NTN} и YBK^{YN-Wilga} вызывают некрозы на клубнях, снижая товарный вид и пищевую ценность картофеля [Вайдеманич с соавт., 1999; Иванюк с соавт., 2005]. В результате экспансии некротических штаммов YBK многие хорошо известные сорта табака и картофеля потеряли свою привлекательность для сельскохозяйственного производства [Horvath *et al.*, 1999; Zagorska *et al.*, 2000; Basky, 2002].

Семеноводство картофеля на безвирусной основе, позволяющее получать свободный от вирусов посадочный материал, является сложным и дорогостоящим мероприятием. Схема защиты от перезаражения растений чаще всего строится на многократном применении инсектицидов для уничтожения переносчиков вирусов – крылатых тлей [Solomon-Blackburn *et al.*, 2001b; Zamalieva *et al.*, 2007]. Интенсивное применение химических средств защиты – не только дорогостоящее, но и небезопасное для окружающей среды и людей мероприятие.

Такие эпидемиологические особенности YBK, как способность к перенесению большим числом крылатых тлей, а также появление все новых штаммов фитопатогена затрудняют его диагностику, селекцию на устойчивость и борьбу с вирусом. Успехами селекции последних лет доказана возможность выведения вирусоустойчивых сортов картофеля. Источниками устойчивости служат примитивные дикие виды и культурные сорта картофеля, несущие гены устойчивости [Росс, 1989; Solomon-Blackburn *et al.*, 2001a]. Методы классической селекции имеют ряд ограничений, главным из которых является длительность создания вирусоустойчивых сортов. Новые возможности в создании устойчивых к вирусам сортов картофеля открываются в связи с разработкой способов получения трансгенных растений. Для создания трансгенной вирусоустойчивости используются разные фрагменты генома самого вируса. Среди всех функциональных последовательностей вируса для трансформации растений наиболее широко используется ген белка оболочки вируса. В 1986 году было обнаружено появления устойчивости растений табака к вирусу табачной мозаики при внедрении в растение гена белка оболочки этого вируса [Powell-Abel *et al.*, 1986]. Впоследствии подобная устойчивость была получена в отношении вирусов различных таксономических групп у наиболее

распространенных сортов табака и картофеля [James, 1998; Solomon-Blackburn *et al.*, 2001b].

На основании вышесказанного особую актуальность приобретает создание устойчивых к вирусам трансгенных растений табака и картофеля, несущих ген белка оболочки особо опасного некротического штамма *YBK*. Оценка эффективности регенерации растений табака и картофеля, трансформированных с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, будет иметь большое теоретическое и практическое значение для повышения эффективности генетической трансформации экономически важных сельскохозяйственных культур. Изучение вирусоустойчивости трансгенных растений позволит углубить понимание механизмов взаимоотношения в системе растение-вирус, что в свою очередь поможет в разработке новых подходов защиты от опасных фитопатогенов. Создание и комплексный анализ трансгенных растений с новыми биологическими свойствами имеет важное значение для биохимии, молекулярной биологии растений, а также для использования таких растений в сельскохозяйственном производстве. Культивирование вирусоустойчивых растений имеет большое значение в локальном и глобальном масштабах для сохранения биоразнообразия сортов сельскохозяйственных культур, обладающих уникальными свойствами, но исчезнувших с производства в связи с распространением опасных фитопатогенов. Прямое практическое значение будет иметь повышение вирусоустойчивости перспективных сортов табака и картофеля, и тем самым восстановление их привлекательности для сельскохозяйственного производства.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось создание устойчивых к вирусам трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих *PVY^{NTN}-CP* ген белка оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y-вируса картофеля.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Оценить эффективность регенерации растений из разных видов эксплантов табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L. для использования в генетической модификации растений с помощью агробактериальной трансформации.

2. Провести генетическую трансформацию растений табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L. *PVY^{NTN}-CP* геном белка оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y-вируса картофеля.

3. Показать интеграцию и экспрессию *PVY^{NTN}-CP* гена в канамицин-устойчивых регенерантах табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L.

4. Выявить устойчивые к вирусам трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., несущие ген *PVY^{NTN}-CP*.

5. Выявить и охарактеризовать тип устойчивости трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих ген *PVY^{NTN}-CP*.

Научная новизна. Генная конструкция *pGAYHCP*, содержащая ген *PVY^{NTN}-CP*, клонированный из венгерского изолята штамма *YBK^{NTN}* кольцеобразного некроза клубней, впервые была использована для генетической

трансформации растений картофеля *S. tuberosum* L. Растения сортов картофеля *S. tuberosum* L. Минденеш и Самодий кифли, и сортов табака *N. tabacum* L. Вирджин Д, Стамм С2 и Хевеши 11 были впервые вовлечены в эксперимент по созданию генетически модифицированных растений. Была показана эффективность использования дисков микроклубней картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли для трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens*.

Впервые получены трансгенные растения табака и картофеля, несущие ген *PVY^{NTN}-CP YBK^{NTN}*. Проведены комплексные молекулярно-биохимические исследования полученных трансгенных растений табака и картофеля. Установлен разный уровень экспрессии СР гена в независимых линиях трансгенных растений табака и картофеля.

Проведены комплексные (лабораторные и полевые) исследования вирусоустойчивости трансгенных растений, несущих *PVY^{NTN}-CP* ген *YBK^{NTN}*, к двум штаммам *YBK* (*YBK^{O/C}*, *YBK^{NTN}*), принадлежащим к разным серотипам. Впервые показано проявление патоген-опосредованной крайней вирусоустойчивости у трансгенных растений, полученных при генетической трансформации растений табака сортов Вирджин Д, Стамм С2 и Хевеши 11, и картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли генной конструкцией, содержащей *PVY^{NTN}-CP* ген *YBK^{NTN}*. Результаты настоящей работы свидетельствуют о сохранении хозяйственно-ценных признаков исходных сортов у вновь созданных трансгенных линий. Показано существенное повышение урожайности и качества получаемой продукции у созданных растений трансгенных линий табака и картофеля.

Практическая значимость. Перспективы внедрения результатов работы определяется двумя аспектами: экономической значимостью картофеля и огромной вредоносностью *YBK*. В мировом масштабе картофель занимает 4-ое место по объемам производства. Во многих странах он составляет основу продовольственной безопасности. Картофель – универсальная сельскохозяйственная культура, также служит сырьем для пищевого и промышленного производства. В связи с этим снижение опасности системных последствий распространения болезней, вызываемых *YBK*, реально уменьшит негативное влияние на экономику стран – производителей картофеля. Полученные трансгенные растения табака и картофеля, обладающие крайней устойчивостью к *YBK*, могут быть использованы в виде новых сортов в сельскохозяйственном производстве и вовлечены в селекционные программы по созданию вирусоустойчивых сортов табака и картофеля методами традиционной селекции. В целом проведенная работа служит наглядным примером сохранения биоразнообразия сортов сельскохозяйственных культур, обладающих уникальными свойствами, но исчезнувших с полей из-за с распространения опасных фитопатогенов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа проводится в соответствии с тематическим планом НИР ГНУ ТатНИИСХ РАСХН 17.01.01. «Создать сорта картофеля с высоким потенциалом продуктивности, устойчивые к болезням и неблагоприятным условиям среды» (2002-2005 гг.), по заказу МСХиП РТ тема

27 «Создать высокопродуктивные сорта картофеля, устойчивые к болезням и неблагоприятным условиям среды» (2002-2005 гг.) Авторские исследования получили персональную поддержку программ UNESCO/BETCEN и Program Biotechnology 2000, Центра сельскохозяйственной биотехнологии, г. Гёдёлё, Венгрия, в рамках которых были созданы трансгенные растения. Полевые испытания вирусоустойчивости полученных трансгенных растений проведены на базе Института селекции картофеля, г. Кестхей, Венгрия (лицензия на испытания генетически модифицированных организмов № 54.570/3/2000) в рамках персонального гранта автора фонда ALF (№ LT97560). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Положения, выносимые на защиту:

1. Наиболее эффективно регенерация трансгенных растений, выявленных по признаку канамицин-устойчивости, трех сортов табака (Вирджин Д, Стамм С2, Хевеши 11) происходит из срезов листовых пластинок, а у двух сортов картофеля (Минденеш, Самодий кифли) из дисков микроклубней.

2. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L. содержат $PVY^{NTN}CP$ ген и синтезируют белок оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y вируса картофеля.

3. Трансгенные растения двух сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. и трех сортов табака *Nicotiana tabacum* L., несущие $PVY^{NTN}CP$ -ген белка оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y-вируса картофеля обладают устойчивостью к двум штаммам ($YBK^{O/C}$ и YBK^{NTN}) Y-вируса картофеля.

4. Восемь независимых линии трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., несущие $PVY^{NTN}CP$ -ген белка оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y-вируса картофеля, обладают крайней устойчивостью к двум штаммам ($YBK^{O/C}$ и YBK^{NTN}) Y-вируса картофеля.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Итоговой отчетной конференции Института ботаники “Institute of Botany annual report” (Вильнюс, 1998), I Всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям (Санкт-Петербург, 2002), XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков» (Минск, 2005), 10-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2006), Международном конгрессе «Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики» (Москва, 2007), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Повышение эффективности растениеводства и животноводства – путь к рентабельному производству» (Казань, 2008), 17-ой конференции Европейской Ассоциации по исследованиям картофеля (Брашов, 2008), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых (Казань, 2008), XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным

университетом и Гиссенским университетом им Ю. Либиха Российско-германской международной конференции «Развитие междисциплинарных исследований: перспективные направления и вклад DAAD» (Казань, 2009), а также на итоговых научных конференциях ГНУ ТатНИИСХ (2001-2008) и научных семинарах кафедры микробиологии Казанского государственного университета (2008, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 научные работы.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, включает 20 таблиц, 16 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 237 источников, из них 219 на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Вектором для генетической трансформации служила генная конструкция pGAYHCP, созданная Коллар с соавторами [Kollar *et al.*, 1993], несущая ген *PVY^{NTN}-CP YBK^{NTN}* (Венгерский изолят PVY-H) [Beczner *et al.*, 1984] под контролем промотора $P_{CaMV\ 35S}$ вируса мозаики цветной капусты и селективный маркерный ген *NTP II* для растений, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину, в пределах Т-ДНК области (рисунок 1).

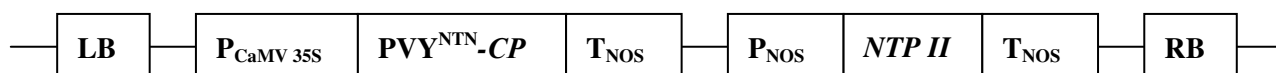


Рисунок 1 - Схема Т-ДНК вектора для экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена в растениях. Структура Т-ДНК вектора, использованного для получения трансгенных растений картофеля. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК, соответственно; $P_{CaMV\ 35S}$ – 35S промотор вируса мозаики цветной капусты; *PVY^{NTN}-CP* – ген белка оболочки *PVY^{NTN}*, T_{NOS} – терминатор гена нопаинсинтазы *A. tumefaciens*, P_{NOS} – промотор гена нопаинсинтазы *A. tumefaciens*, *NTP II* – ген неомицин-фосфотрансферазы II, селективный маркерный ген для растений.

Трансформацию растений табака и картофеля проводили с использованием Gram- C58C1 (Rif^r) штамма *Agrobacterium tumefaciens* [Zambryski *et al.*, 1983].

Вирусные штаммы. Вирусологический анализ трансгенных растений проводили с использованием очищенных вирусных частиц двух штаммов: *YBK^{NTN}* (изолят D-10) и *YBK^{O/C}* (изолят Ка-49) [Wolf *et al.*, 2000].

Асептические, безвирусные растения картофеля *Solanum tuberosum* L. двух сортов венгерской селекции Минденеш (М) и Самодий кифли (SK) (из коллекции Института селекции картофеля (г. Кестхей, Венгрия) были использованы для создания трансгенных растений. Оба сорта характеризуются низкой устойчивостью к *YBK^{NTN}*.

Растения табака *Nicotiana tabacum* L., использованные для создания трансгенных растений, были представлены германским сортом Вирджин Д (VD), германским гибридом Стамм С2 (SC) и венгерским сортом Хевеши 11 (H11).

Растения вышеперечисленных сортов и гибрида являются неустойчивыми к $YBK^{O/C}$ и YBK^{NTN} . Семена были получены из селекционно-семеноводческой компании Agrotab Breeding and Seed Production Ltd. (г. Дебрецен, Венгрия).

Культивирование растений в асептической культуре и создание трансгенных растений. Для выращивания нетрансгенных растений табака и картофеля использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) [Murashige *et al.*, 1962]. Микроклубни получали в асептической культуре на микрочеренках растений картофеля [Borque *et al.*, 1987]. Трансформацию дисков микроклубней, и регенерацию растений картофеля проводили согласно указаниям Ишида с соавторами [Ishida *et al.*, 1989]. Трансформацию листовых и стеблевых эксплантов, и регенерацию растений картофеля проводили согласно указаниям Ан с соавторами [An *et al.*, 1986]. Трансформацию срезов листовых пластинок и сегментов корней, и регенерацию растений табака проводили согласно указаниям Хорш с соавторами [Horsch *et al.*, 1988].

Анализ интеграции PVY^{NTN} -CP гена в геноме Km^r -регенерантов табака и картофеля проводили с помощью ПЦР [Jozsa *et al.*, 2002] и Саузерн-блоттинг гибридизации [Sambrook *et al.*, 1989].

Определение экспрессии PVY^{NTN} -CP гена в трансгенных растениях проводили методом нозерн-блоттинг гибридизации и с помощью иммуноблоттинга (вестерн-блоттинг анализ) [Sambrook *et al.*, 1989]. Радиоактивные зонды для нозерн-блоттинг гибридизации готовили методом включения ^{32}P - радиоактивно меченых нуклеотидов во время синтеза РНК с помощью ДНК-зависимой РНК полимеразы фага Т7 на матрице – линейной плазмиде, содержащей PVY^{NTN} -CP ген [Sambrook *et al.*, 1989]. При вестерн-блоттинг анализе для выявления белка оболочки в исследуемых образцах трансгенных растений использовали антитела, специфичные к YBK , сопряженных с щелочной фосфатазой (Anti-potato virus Y-antibody-AP-conjugate Boehringer Mannheim GmbH Cat No. 647 420).

Определение вирусной РНК в растениях табака проводили с помощью дот-блот анализа [Sambrook *et al.*, 1989].

Определение YBK в растениях проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), используя поликлональные антитела к YBK (Loewe Biochemica GmbH) согласно методике, описанной Кларк и Адамс [Clark *et al.*, 1977] и с помощью биотеста на индикаторных растениях межвидового гибрида $A6 S. demissum$ x $S. tuberosum$.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля проводили с помощью (1) искусственного заражения растений картофеля очищенными вирусными препаратами двух штаммов YBK (YBK^{NTN} и $YBK^{O/C}$) в теплице, (2) заражения с помощью переносчиков вирусов (крылатых тлей) в условиях высокого инфекционного фона YBK^{NTN} в полевых условиях и (3) инокуляции методом прививки на инфицированные YBK^{NTN} растения табака и томата.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений табака проводили с помощью (1) искусственного заражения растений табака очищенными вирусными препаратами двух штаммов YBK (YBK^{NTN} и $YBK^{O/C}$) в теплице и (2)

заражения с помощью переносчиков вирусов (крылатых тлей) в условиях высокого инфекционного фона YBK^{NTN} в полевых условиях.

Результаты исследований

Получение микроклубней картофеля в условиях асептической культуры. Среднее количество микроклубней на один микрочеренок составило 0,88 штук у сорта Минденеш и 0,92 штуки у сорта Самодий кифли. У сорта Минденеш 86% микроклубней картофеля были больше 3 мм. Данный показатель у сорта Самодий кифли был ниже и составил 61%. У данного сорта 39% микроклубней были меньше 3мм.

Подбор эксплантов для трансформации. В результате проведенного исследования в качестве эксплантов для со-культивации с *A. tumefaciens* были определены срезы листовых пластинок (1-2 см²) табака и диски микроклубней картофеля (таблица 1).

Таблица 1

Регенерация растений табака и картофеля из эксплантов, трансформированных генной конструкцией pGAYHCP с помощью штамма C58C1 *A. tumefaciens*

Исходный сорт	Тип экспланта	Количество, штуки		
		Экспланты	Регенеранты	Регенеранты на один эксплант
Табак <i>N. tabacum</i> L.				
Вирджин Д	срезы листовых пластинок	10 ¹ / 10 ² / 10 ³	41 ¹ / 0 ² / 18 ³	4,1 ¹ / 0 ² / 1,8 ³
	сегменты корней	20 / 20 / 20	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Стамм С2	срезы листовых пластинок	10 / 10 / 10	63 / 0 / 34	6,3 / 0 / 3,4
	сегменты корней	20 / 20 / 20	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Хевеши 11	срезы листовых пластинок	10 / 10 / 10	37 / 0 / 13	3,7 / 0 / 1,3
	сегменты корней	20 / 20 / 20	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Картофель <i>S. tuberosum</i> L.				
Минденеш	листья	10 / 10 / 10	8 / 0 / 1	0,8 / 0 / 0,05
	сегменты стеблей	20 / 20 / 20	14 / 0 / 0	0,35 / 0 / 0
	диски микроклубней	10 / 10 / 10	18 / 0 / 9	1,8 / 0 / 0,9
Самодий кифли	листья	10 / 10 / 10	6 / 0 / 0	0,6 / 0 / 0
	сегменты стеблей	20 / 20 / 20	7 / 0 / 0	0,18 / 0 / 0
	диски микроклубней	5 / 5 / 10	7 / 0 / 4	1,4 / 0 / 0,8

Примечания: ¹ – неинокулированные *A. tumefaciens* экспланты культивировали на соответствующих питательных средах для индукции каллусо- и побегообразования без добавления бактериостатического (Сх 500мг/л) и селективного агентов (Км 100 мг/л) ² – неинокулированные *A. tumefaciens* экспланты культивировали на соответствующих питательных средах для индукции каллусо- и побегообразования (питательная среда + Сх 500мг/л + Км 100мг/л); ³ –инокулированные *A. tumefaciens* экспланты культивировали на соответствующих питательных средах для индукции каллусо- и побегообразования (питательная среда + Сх 500мг/л + Км 100мг/л).

Трансформация и регенерация растений картофеля *S. tuberosum* L. Прямую регенерацию Км^r-побегов с трансформированных дисков микроклубней картофеля проводили в течение 80 дней. Большинство регенерантов было получено в промежутке между 25-50 днями инкубации на канамицин содержащей селективной

среде (100 мг/л). Всего было получено 37 Km^r -регенерантов сорта Минденеш (рисунок 2) и 4 – сорта Самодий кифли.



Рисунок 2 (А) - Регенерация Km^r -микрорастений картофеля сорта Минденеш на питательной среде, содержащей селективный агент канамицин (100 мг/л). (Б) Тепличное трансгенное растение картофеля (M11), несущее ген $PVY^{NTN}-CP$.

Трансформация и регенерация растений табака *N. tabacum* L.
Регенерация побегов табака проходила через промежуточную стадию образования каллуса по периметру листовых эксплантов с последующей индукцией регенерации побегов (рисунок 3А). Концентрация селективного агента канамицина в питательной среде составила – 300 мг/л. Всего в результате агробактериальной трансформации срезов листовых пластинок табака было получено 116 линий Km^r -регенерантов табака: 38 из эксплантов сорта VD (рисунок 3Б), 55 – из гибрида SC и 23 – из сорта Н11.

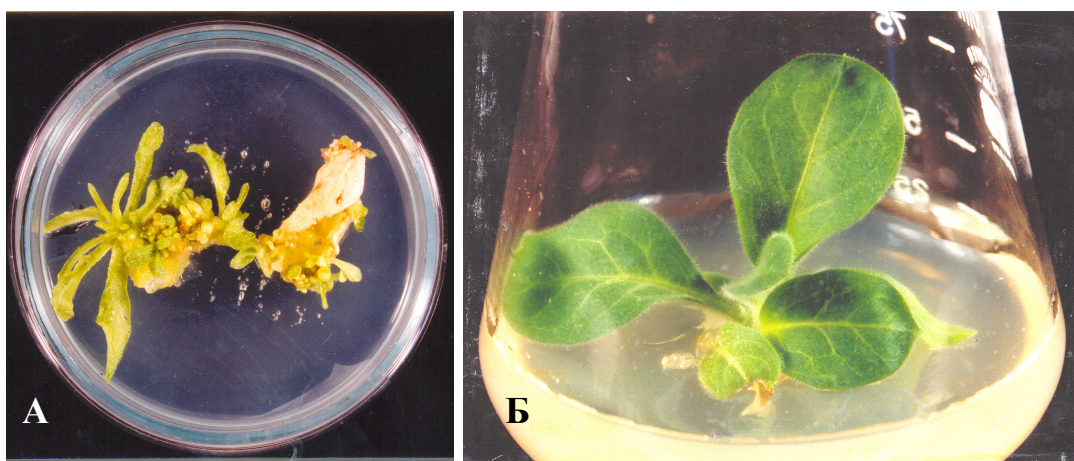


Рисунок 3 (А) - Регенерация побегов табака из трансформированных клеток листовых срезов табака сорта SC через стадию каллуса на селективной питательной среде, содержащей Km (300 мг/л). (Б) - Укоренение регенерировавшего побега табака VD5 на питательной среде, содержащей Km (100 мг/л).

Анализ интеграции $PVY^{NTN}-CP$ гена в геном растений табака и картофеля. Методом ПЦР интеграция $PVY^{NTN}-CP$ гена в геном растений была показана у 153 из 157 исследованных Km^r -регенерантов табака и картофеля (рисунок 4; таблица 2).

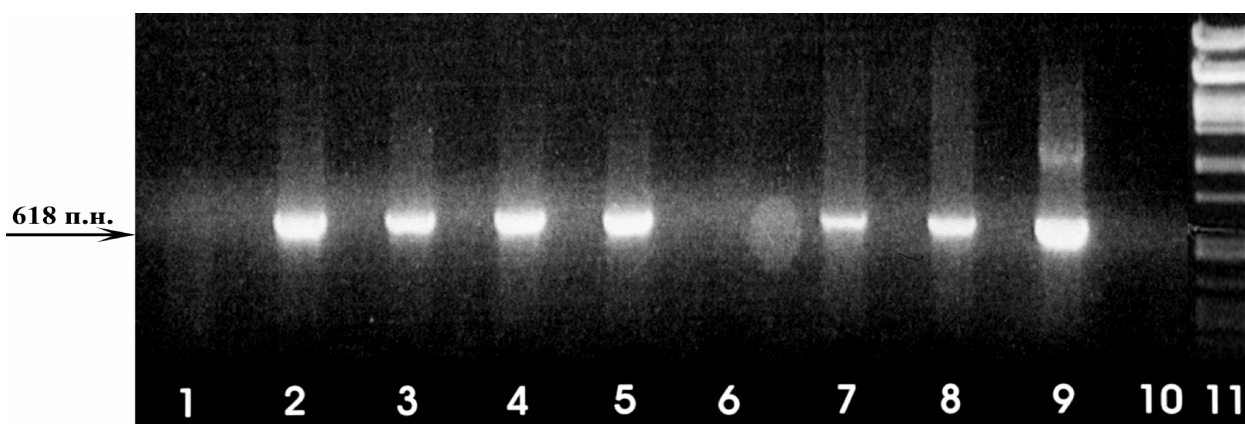


Рисунок 4 - ПЦР анализ Km^r -регенерантов картофеля сорта Минденеш на наличие PVY^{NTN} -CP гена в трансформированных растениях. 1 – отрицательный контроль – нетрансформированное растение сорта М; 2-8 – ДНК Km^r -регенерантов картофеля М2 М3, М4, М5, М6, М7, М8; 9 – положительный контроль – ДНК плазмиды рGAYHCP; 10 – отрицательный контроль – ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы; 11 – маркер молекулярной массы – ДНК фага λ , обработанная рестриктазой *Pst*I.

Таблица 2

Результаты анализа интеграции PVY^{NTN} -CP гена в геном растений табака и картофеля

Линии трансгенных растений табака и картофеля, полученные из исходных сортов	Количество, шт.		Доля PVY^{NTN} -CP (+) трансгенных растений от числа Km^r -регенерантов, %
	Km^r -регенеранты	PVY^{NTN} -CP (+) трансгенные растения	
Табак			
Вирджин Д	38	38	100
Стамм С2	55	53	96
Хевеши 11	23	23	100
Картофель			
Минденеш	37	35	95
Самодий кифли	4	4	100
Всего	157	153	

Изучение экспрессия PVY^{NTN} -CP гена в трансгенных растениях табака и картофеля. Анализ накопления РНК транскриптов PVY^{NTN} -CP гена был проведен у 3 трансгенных растений табака (SC3, VD21, VD7) и 3 трансгенных растений картофеля (М2, М3, М4), несущих PVY^{NTN} -CP ген. Данный анализ также был проведен у Km^r -регенеранта картофеля М6, у которого PVY^{NTN} -CP ген не был выявлен с помощью ПЦР анализа (рисунок 4). Результаты Нозерн-блот анализа показали наличие РНК транскриптов трансгена во всех исследованных трансгенных растениях, несущих PVY^{NTN} -CP ген. РНК транскрипт трансгена отсутствовал у Km^r -регенеранта картофеля М6, у которого PVY^{NTN} -CP ген не был выявлен с помощью ПЦР анализа (рисунок 5). Уровень накопления РНК транскриптов PVY^{NTN} -CP гена в исследованных трансгенных растениях табака и картофеля был примерно одинаковым, за исключением линии VD21, где выявлено меньшее количество РНК транскрипта трансгена.

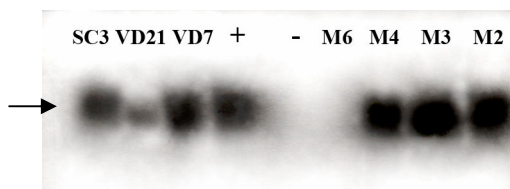


Рисунок 5 - Нозерн-блот анализ транскрипции *PVY^{NTN}-CP* гена в трансгенных растениях картофеля и табака. Стрелкой показано положение РНК транскрипта, интродуцированного в трансгенные растения гена *PVY^{NTN}-CP*. + – положительный контроль – РНК нетрансформированного, свободного от вирусной инфекции растения табака сорта Вирджин Д с добавлением РНК, синтезированной ДНК-зависимой РНК полимеразой фага Т7 на матрице – линейной плазмиде, содержащей *PVY^{NTN}-CP* ген; – – отрицательный контроль – РНК нетрансформированного, свободного от вирусной инфекции растения табака сорта Вирджин Д; SC3, VD21, VD7, M6, M4, M3, M2 – РНК трансгенных растений табака (SC3, VD21, VD7) и картофеля (M6, M4, M3, M2).

Методом вестерн-блоттинг гибридизации экспрессия СР *YBK^{NTN}* была показана у 125 (80%) трансгенных растений табака и картофеля из числа 153 изученных независимых линий трансгенных растений, несущих *PVY^{NTN}-CP* ген. У 29 (19%) линий трансгенных растений табака и картофеля, у которых интеграция трансгена в растительный геном была показана с помощью ПЦР анализа, экспрессия СР *YBK^{NTN}* не была выявлена. Содержание белкового продукта трансгена в образцах независимых линий трансгенных растений табака и картофеля варьировало от очень низкого до высокого (рисунок 6, таблица 3). Сравнительный анализ результатов изучения уровня экспрессии СР в трансгенных растениях табака и картофеля, принадлежащих к разным линиям, позволил выявить некоторые закономерности экспрессии трансгена и различия между группами линий, полученными на основании генетической трансформации *PVY^{NTN}-CP* геном разных сортов табака и картофеля (таблица 3). Значительная часть линий трансгенных растений табака и картофеля показывала высокий (32%) и средний (30%) уровень экспрессии СР. Больше всего трансгенных линий с высоким (42%) и средним (45%) уровнем экспрессии СР было выявлено у трансформантов сорта табака Вирджин Д. Меньше всего трансгенных линий с данными характеристиками (26% и 25%) экспрессии СР было обнаружено у трансформантов гибрида табака Стамм С2. Линии трансгенных растений табака и картофеля с низким содержанием продукта трансгена (19%) и линии в которых СР *YBK^{NTN}* не был обнаружен (19%) составили меньше половины всех *PVY^{NTN}-CP* ген несущих регенерантов данных культур. 11 (31%) линий трансгенных растений, полученных в результате генетической трансформации картофеля сорта Минденеш, показывали низкий и очень низкий уровень экспрессии трансгена. У 19 (36%) *PVY^{NTN}-CP* (+) линий, принадлежащих к группе трансформантов табака сорта Стамм С2, не было установлена экспрессия СР *YBK^{NTN}*. Интересно отметить, что БО *YBK^{NTN}* был выявлен во всех *PVY^{NTN}-CP* ген несущих трансгенные растения, полученных в результате генетической трансформации табака сорта Вирджин Д. Всего 5 растений, принадлежащих к данной группе трансформантов, показали низкий уровень экспрессии гетерологичного белка.

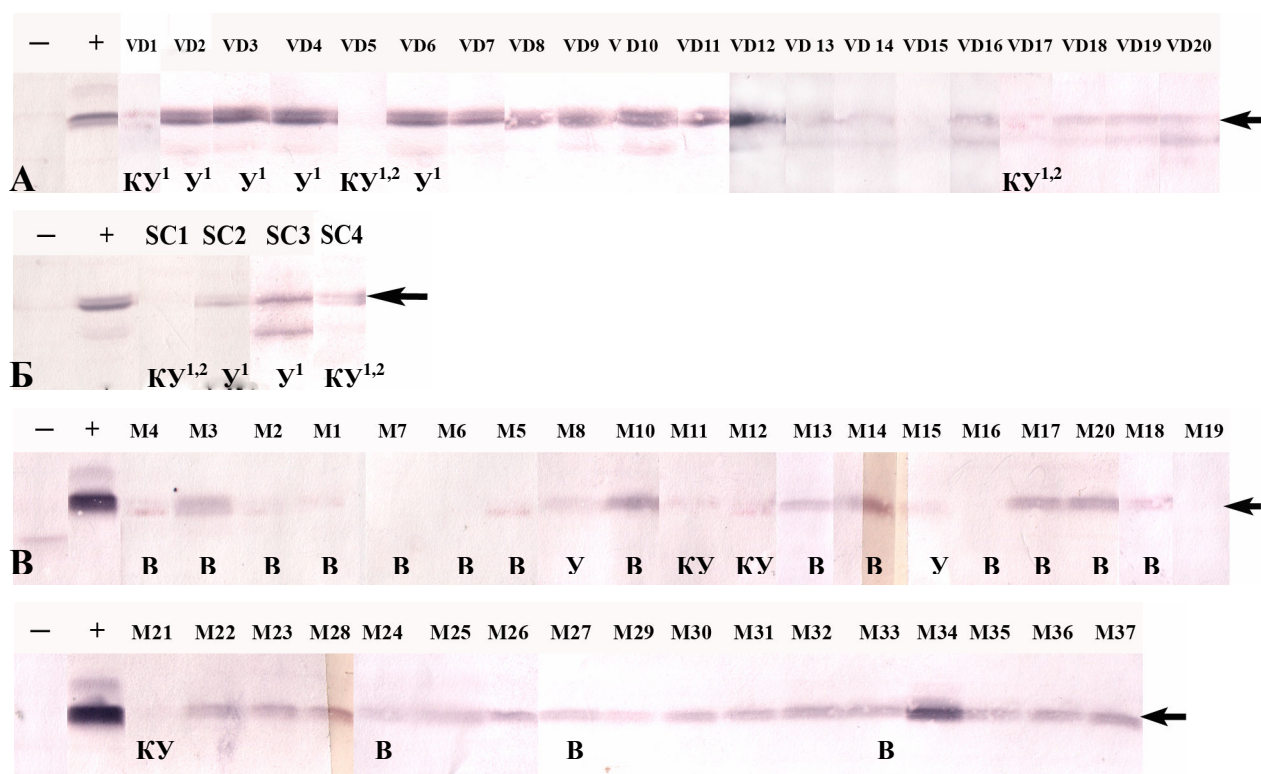


Рисунок 6 - Вестерн-блот анализ экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена в трансгенных растениях табака сортов Вирджин Д (А), Стамм С2 (Б) и картофеля сорта Минденеш (В). Стрелкой показано положение CP *YBK^{NTN}*. — – отрицательный контроль – экстракты белков нетрансгенных, свободных от вирусной инфекции растений соответствующих сортов табака; + – положительный контроль – экстракты белков нетрансгенных, *YBK^{NTN}* инфицированных растений соответствующих сортов табака и картофеля; VD3-VD20 (А), SC1-SC3 (Б) и M4-M37 (В) – экстракты белков независимых линий трансгенных растений табака и картофеля, полученных в результате генетической трансформации растений табака сортов Вирджин Д (А), Стамм С2 (Б) и картофеля сорта Минденеш (В). Степень устойчивости (В – восприимчивый, У – устойчивый, КУ – крайне устойчивый) независимых линий трансгенных растений табака и картофеля к *YBK* при механической инокуляции в тепличных условиях ⁽¹⁾ (А, Б) и инфицировании с помощью вирусных векторов в полевых условиях ⁽²⁾ (А, Б, В).

Таблица 3

Экспрессия *PVY^{NTN}-CP* гена в трансгенных растениях табака и картофеля

Название линии	Количество <i>PVY^{NTN}-CP</i> (+) линий, показывающих разный уровень экспрессии CP, шт. (доля CP (+) линий от общего числа <i>PVY^{NTN}-CP</i> (+) линий, %)			
	Высокий	Средний	Низкий	CP (-)
VD ¹	16 (42)	17 (45)	5 (13)	-
SC ¹	14 (26)	13 (25)	8 (15)	19 (36)
H11 ¹	7 (30)	6 (26)	4 (18)	6 (26)
M ²	11 (31)	10 (29)	11 (31)	3 (9)
SK ²	2 (50)	-	1 (25)	1 (25)
Всего	50 (32)	46 (30)	29 (19)	29 (19)

Примечания: ¹ – линии трансгенных растений табака *N. tabacum* L., полученные в результате генетической трансформации растений табака сортов Вирджин Д (VD), Стамм С2 (SC) и Хевеши 11 (H11); ² – линии трансгенных растений картофеля *S. tuberosum* L., полученные в результате генетической трансформации растений картофеля сортов Минденеш (M) и Самодий кифли (SK).

Изучение стабильности экспрессия PVY^{NTN} -CP гена в трансгенных растениях табака и картофеля. Экспрессия генов растений меняется в онтогенезе и под воздействием внешних факторов. Для изучения стабильности экспрессии PVY^{NTN} -CP гена в трансгенных растениях табака и картофеля на трех стадиях развития растений проводили вестерн-блоттинг анализ. Первый (I) – спустя 2 недели после высадки укоренившихся Km^r -регенерантов в почву. Второй (II) – на стадии бутонизации и цветения и третий (III) – на стадии созревания семян табака и накопления урожая клубней картофеля. В результате было установлено, что в линиях трансгенных растений, в которых не был обнаружен CP YBK^{NTN} (SC1, M7, M16) на ранней стадии развития, он также отсутствовал во время бутонизации-цветения и стадии созревания. Также была показана стабильность уровня экспрессии трансгена в растениях трансгенных линий (VD5, SC2, SC3, M8), в которых CP YBK^{NTN} был выявлен на ранней стадии развития (рисунок 7).

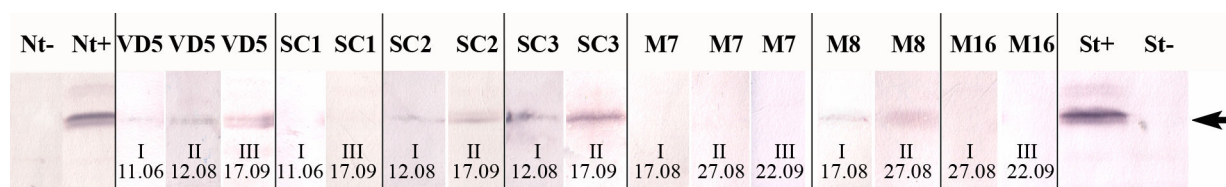


Рисунок 7 - Сравнительное изучение экспрессии PVY^{NTN} -CP гена на разных стадиях развития трансгенных растений картофеля и табака с помощью вестерн-блоттинг анализа. Стрелкой показано положение CP YBK^{NTN} . Nt-, St- – отрицательный контроль – экстракты белков нетрансгенных, свободных от вирусной инфекции растений табака и картофеля; Nt+, St+ – положительный контроль – экстракты белков нетрансгенных, YBK^{NTN} инфицированных растений табака и картофеля. VD5, SC1, SC2, SC3, M7, M8, M16 – экстракты белков независимых линий трансгенных растений табака и картофеля, несущих PVY^{NTN} -CP ген YBK^{NTN} . В нижней части рисунка указана стадия развития растения (расшифровка указана в тексте) и дата проведения анализа.

Наблюдения за экспрессией PVY^{NTN} -CP гена при вегетативном размножении картофеля микрочеренкованием в асептической культуре и размножении клубнями показали стабильность экспрессии трансгена, как у регенерантов, полученных из трансформированных клеток, так и у их вегетативного потомства.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений табака. В группах линий VD и SC выход трансгенных растений, обладающих крайней устойчивостью к двум штаммам YBK (YBK^{NTN} , $YBK^{O/C}$) был низким. Данный тип устойчивости определял высокую эффективность защиты трансгенных растений против вирусной инфекции, вносимой при механической инокуляции и передаваемой вирусными векторами. Среди линий, полученных из исходного сорта H11, трансгенных растений с крайней устойчивостью не выявлено. Все оставшиеся независимые линии трансгенных растений, принадлежащие к группам VD, SC и H11, обладали «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью. Отдельные независимые линии трансгенных растений отличались по скорости «восстановления» вирусоустойчивости. Во всех изученных трансгенных растениях табака крайняя вирусоустойчивость и

«восстанавливающееся» вирусоустойчивость распространялись на оба штамма *YBK* (*YBK^{NTN}*, *YBK^{O/C}*), использованных для изучения вирусоустойчивости (таблица 4).

Таблица 4

Результаты изучения вирусоустойчивости трансгенных растений табака, несущих ген *PVY^{NTN}-CP*

Линии трансгенных растений табака, полученные из исходных сортов	Крайне устойчивые к <i>YBK</i> / устойчивые к <i>YBK</i> / инфицированные <i>YBK</i> линии трансгенных растений табака		
	Механическая инокуляция в теплице ¹		Искусственный инфекционный фон <i>YBK^{NTN}</i> в поле
	<i>YBK^{NTN}</i>	<i>YBK^{O/C}</i>	
Вирджин Д (VD)	3 / 4 / 7	3 / 4 / 7	2 / 0 / 2
Стамм С2 (SC)	2 / 14 / 16	2 / 14 / 16	2 / 0 / 2
Хевеши 11 (H11)	0 / 12 / 12	0 / 12 / 12	–

Примечания: ¹ – 5 мкг/мл очищенного вируса.

Определение вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля. Двадцать три линии трансгенных растений картофеля М и четыре – SK, полученные соответственно на основе растений исходных сортов Минденеш и Самодий кифли, несущих ген *PVY^{NTN}-CP*, были изучены на проявление патоген-опосредованной вирусоустойчивости. Было выявлено три линий (M11, M12 и M21) трансгенных растений, обладающих крайней устойчивостью к двум штаммам *YBK* (*YBK^{NTN}*, *YBK^{O/C}*). Данный тип устойчивости определял высокую эффективность защиты трансгенных растений против вирусной инфекции, вносимой при механической инокуляции, передаваемой вирусными векторами и при инокуляции прививкой на инфицированные растения семейства пасленовых. Среди линий, полученных из исходного сорта SK, трансгенных растений с крайней устойчивостью не выявлено. У трансгенных растений линий M8, M9, M15 было показано проявление крайней формы патоген-опосредованной «восстанавливающейся» устойчивости. Все оставшиеся независимые линии трансгенных растений, принадлежащие к группам М и SK, обладали «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью. Отдельные независимые линии трансгенных растений отличались по скорости «восстановления» вирусоустойчивости. Во всех изученных трансгенных растениях табака крайняя вирусоустойчивость и «восстанавливающееся» вирусоустойчивость распространялись на оба штамма *YBK* (*YBK^{NTN}*, *YBK^{O/C}*), использованных для изучения вирусоустойчивости (таблица 5).

Таблица 5

Результаты изучения вирусоустойчивости трансгенных растений картофеля, несущих ген *PVY^{NTN}-CP*

Линии трансгенных растений картофеля, полученные из исходных сортов	Крайне устойчивые к <i>YBK</i> / устойчивые к <i>YBK</i> / инфицированные <i>YBK</i> линии трансгенных растений картофеля			
	Механическая инокуляция в теплице ¹		Искусственный инфекционный фон <i>YBK^{NTN}</i> в поле	Прививка на инфицированные <i>YBK^{NTN}</i> растения
	<i>YBK^{NTN}</i>	<i>YBK^{O/C}</i>		
Минденеш (М)	6 / 17 / 23	6 / 17 / 23	3 / 3 / 23	3/3
Самодий кифли (SK)	0 / 4 / 4	0 / 4 / 4	0 / 0 / 4	–

Примечания: ¹ – 20 мкг/мл очищенного вируса.

Обсуждение результатов

В настоящей работе нами были получены устойчивые к *YBK* трансгенные растения табака и картофеля из исходных восприимчивых к данному вирусу растений сортов данных культур. Используемые нами перспективные сорта табака и картофеля были впервые вовлечены в эксперименты по созданию генетически модифицированных растений, обладающих экономически значимыми биологическими свойствами.

Получение микроклубней картофеля в условиях асептической культуры. Эффективная система получения микроклубней картофеля в асептической культуре имеет большое значение для биохимических и биотехнологических экспериментов. В результате анализа литературных данных, нами был подобран способ индукции клубнеобразования, основанный на имитировании клубнеобразования в естественных условиях [Borque *et al.*, 1987]. Полученные нами результаты исследований свидетельствуют о достаточно высокой эффективности индукции клубнеобразования у сортов Минденеш (88%) и Самодий кифли (92%). Однако у сорта Самодий кифли образовывались сильно удлиненные и тонкие микроклубни, из которых удалось приготовить лишь небольшое количество эксплантов, оказавшихся пригодными для агробактериальной трансформации. Возможно, формирование сильно удлиненных и тонких микроклубней у данного сорта является следствием генотип-специфического взаимодействия растений данного сорта с содержащей фитогормон питательной средой [Ranlli, 2007].

Трансформация и регенерация растений картофеля *S. tuberosum* L. При подборе эксплантов для агробактериальной трансформации в виде основных критериев были выделены: 1) эффективность регенерации побегов на селективной среде; 2) отсутствие регенерации побегов на нетрансформированных эксплантах в условиях селективного давления антибиотика; 3) универсальность эксплантов разных сортов по отношению к питательной среде [Дрейпер с соавт., 1991]. Нами было экспериментально установлено, что всем критерием соответствовали диски микроклубней картофеля сортов Минденеш и Самодий кифли. Следует отметить, что эффективность действия селективного агента и продолжительность процесса регенерации зависели от толщины экспланта. Установлено, что для агробактериальной трансформации целесообразно использовать диски микроклубней картофеля с двухсторонним срезом и толщиной 2-3 мм. По-видимому, микроорганизмы *A. tumefaciens* наиболее эффективно трансформировали недифференцированные клетки меристематической ткани, находящиеся в почках (глазках) дисков микроклубней. В целом диски микроклубней картофеля являются удобными эксплантами для использования в экспериментах агробактериальной трансформации картофеля.

Методика трансформации листьев и сегментов стеблей картофеля, описанная Ан с соавторами [An *et al.*, 1986], оказалась неэффективной в случае сортов Минденеш и Самодий кифли. Результаты наших исследований позволяют предположить, что в случае листовых эксплантов сортов Минденеш

и Самодий кифли причиной отсутствия процесса регенерации побегов являлась слишком высокая концентрация селективного агента канамицина (100 мг/л). Данный факт, далее подтвержденный другими исследователями [Bukovinszki *et al.*, 2007], свидетельствует о необходимости разработки безмаркерной системы агробактериальной трансформации листовых эксплантов сортов Минденеш и Самодий кифли. Полное отсутствие регенерации побегов из стеблевых эксплантов сортов Минденеш и Самодий кифли в первую очередь свидетельствует о необходимости оптимизации состава питательных сред. Другой возможной причиной может быть слишком маленькая площадь контакта микроорганизмов с зоной делящихся клеток (камбий / перицикл) у сегментов стеблей картофеля [Beaujean *et al.*, 1998].

Вирусоустойчивость трансгенных растений табака и картофеля

Фенотипическое проявление патоген-опосредованной

вирусоустойчивости трансгенных растений. Полученные линии трансгенных растений табака и картофеля обладали разной степенью устойчивости к *YBK*. Пять независимых линий трансгенных растений табака и три независимые линии трансгенных растений картофеля показали крайнюю степень вирусоустойчивости к *YBK* (рисунок 6, таблицы 4, 5). Среди независимых линий трансгенных растений табака и картофеля также был выявлен полиморфизм уровня экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена. Основываясь на результатах сравнительного изучения данных вестерн-блот анализа независимых линий трансгенных растений нами были выделены три уровня экспрессии CP: высокий, средний и низкий. Также были обнаружены линии трансгенных растений, у которых CP не был показан с помощью вестерн-блоттинг анализа (рисунок 6). Анализ уровня экспрессии CP и степени вирусоустойчивости трансгенных растений, несущих *PVY^{NTN}-CP* ген *YBK^{NTN}*, показал, что у большинства линий обладающих крайней вирусоустойчивостью уровень экспрессии CP был низким (рисунок 6). В одной из данных линий (SC1) CP не был выявлен, в двух других – уровень экспрессии данного белка был средним (SC4) и высоким (M21). Среди трансгенных растений табака и картофеля, показывающих «восстанавливающуюся» вирусоустойчивость, уровень экспрессии CP варьировал от высокого до низкого. У некоторых из данных линий CP не был выявлен. Опираясь на вышеизложенные факты можно сделать предположение, что в большинстве случаев вирусоустойчивость трансгенных растений, несущих *PVY^{NTN}-CP* ген *YBK^{NTN}*, не зависит от экспрессии CP в клетках данных растений. Результаты, указывающие на непричастность или по крайней мере низкий уровень влияния CP вируса, кодируемого трансгеном, были получены разными исследователями [Lindo *et al.*, 1992; Van der Vlugt *et al.*, 1992; Kollar *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1995].

*Штаммоспецифичность вирусоустойчивости трансгенных растений, опосредованной *PVY^{NTN}-CP* геном *YBK^{NTN}*.* Степень штаммоспецифичности зависит от подобранной исследователем последовательности трансгена. Нами обнаружено, что вирусоустойчивость трансгенных растений, несущих *PVY^{NTN}-CP* ген *YBK^{NTN}*, проявляется в одинаковой степени к двум штаммам: *YBK^{NTN}* и *YBK^{O/C}*, относящимся к разным серотипам. Данный факт дает возможность полагать, что *PVY^{NTN}-CP* геном опосредованная вирусоустойчивость не является штаммоспецифичной и распространяется на разные штаммы *YBK*.

Механизм патоген-опосредованной вирусоустойчивости трансгенных растений. Среди 153 линий трансгенных растений табака и картофеля, в которых была подтверждена интеграция PVY^{NTN} -СР ген YBK^{NTN} , выявлено большое разнообразие комбинаций, включающих определенный уровень экспрессии белка трансгена с определенной степенью вирусоустойчивости (рисунок 6). Полученные нами результаты не противоречат данным литературы, свидетельствующим о разнообразии сочетаний разных уровней экспрессии СР с разными уровнями вирусоустойчивости трансгенных растений [Lindbo *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1996, Jozsa *et al.*, 2002a, b]. В связи с этим, группировка трансгенных растений по степени проявления данных признаков представляла собой сложную задачу.

Наиболее малочисленную группу трансгенных растений составляли линии, показывающие низкий или не детектируемый уровень экспрессии СР в сочетании крайней устойчивостью к YBK . По-видимому, данные трансгенные растения содержат оптимальное количество копий трансгена, обеспечивающее оптимальный уровень его экспрессии, необходимый для запуска механизма РНК-интерференции [Goodwin *et al.*, 1996]. Промежуточное положение между трансгенными растениями вирусоустойчивых линий и восприимчивыми к вирусу нетрансгенными растениями исходных сортов, занимали линии трансгенных растений табака и картофеля, обладающие «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью. Вероятно, данные трансгенные растения, показывающие высокий или средний уровень экспрессии СР и обладающие «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью, имели одну или две копии трансгена в своем геноме (рисунок 6). Согласно модели экспрессии «порогового» уровня РНК транскрипта трансгена, где ключевое место занимает доза гена [Goodwin *et al.*, 1996], одной копии трансгена, даже находящейся под контролем сильного промотора, чаще всего не хватает для проявления высокой степени вирусоустойчивости трансгенных растений. Большинство трансгенных растений, содержащих одну копию трансгена, показывают «восстанавливающуюся» вирусоустойчивость. Созданные нами трансгенные растения, показывающие низкий уровень экспрессии СР, или у которых не был выявлен СР, и обладающие «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью, возможно, имели слишком большое количество копий трансгена (≥ 8). Вероятней всего к их числу принадлежали трансгенные растения с медленно «восстанавливающейся» вирусоустойчивостью. Известно, что в таких растениях РНК транскрипты трансгена не обнаруживаются, или уровень транскрипции множественных копий трансгена бывает очень низким. В данном случае в клеточном ядре блокируется сам процесс транскрипции трансгена, и в цитоплазму вообще не поступает или поступает лишь небольшое количество РНК транскрипта трансгена. У растений инструментом регуляции транскрипции ДНК является связанное с РНК-интерференцией метилирование ДНК [English *et al.*, 1996].

По-другому представляется проявление вирусоустойчивости в нескольких созданных нами трансгенных растений, обладающих крайней степенью вирусоустойчивости при среднем (SC4) или высоком (M21) уровне экспрессии СР. Вероятней всего в данных трансгенных растениях

вирусоустойчивость в значительной степени была обусловлена СР-опосредованной супрессией репликации вирусной РНК [Chapman *et al.*, 1992].

Патоген-опосредованное подавление супрессии РНК-интерференции в вирусоустойчивых трансгенных растениях. Важным моментом при создании вирусоустойчивых растений является преодоление защитных механизмов вируса. Результаты наших экспериментов позволяют полагать, что полученные трансгенные растения, обладающие крайней степенью устойчивости к *YBK*, в результате экспрессии *PVY^{NTN}-CP* гена подавляли защитный механизм *YBK*, препятствующий деградации его РНК в растениях. Вирусы растений в процессе эволюции приобрели способность противостоять действию посттранскрипционного сайленсинга генов с помощью супрессоров белковых комплексов, вовлеченных в механизм РНК-интерференции. В случае *YBK* сильным супрессором РНК-интерференции является белок хелперного компонента-протеазы (НС-Pro) вируса [Solomon-Blackburn *et al.*, 2001]. Наиболее вероятно, что в полученных нами трансгенных растениях, обладающих крайней формой устойчивости, РНК-интерференция инициируется сразу после (или даже во время) проникновения вирусной РНК в клетки трансгенного растения. Так, в инокулированных *YBK* трансгенных растениях табака, обладающих крайней вирусоустойчивостью, нам не удалось с помощью дот-блот гибридизации обнаружить вирусную РНК. Также, в инокулированных *YBK* трансгенных растениях картофеля, обладающих крайней вирусоустойчивостью, не обнаружено развития симптомов, ИФА не показал накопление *YBK*.

Практическое значение патоген-опосредованной вирусоустойчивости трансгенных растений. В целом, результаты проведенных нами исследований показывают большую практическую значимость *PVY^{NTN}-CP* геном опосредованной вирусоустойчивости для таких экономически важных культур, как картофель и табак. Нами была показана перспективность стратегии создания новых сортов сельскохозяйственных растений с помощью интеграции целевых генов, обеспечивающих высокоэффективное проявление экономически значимых свойств данных растений, таких как высокая урожайность, высокое качество получаемой продукции и сохранение уникального сочетания основных качественных характеристик исходных сортов. Более того, ряд полученных нами трансгенных растений отвечают требованиям повышенной биологической безопасности. Низкий уровень накопления СР у вирусоустойчивых трансгенных растений снижает риск распространения продуктов трансгена в окружающей среде и тем самым способствует более интенсивному использованию механизма патоген-опосредованной вирусоустойчивости при создании новых сортов сельскохозяйственных растений.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наиболее эффективно регенерация трансгенных растений, выявленных по признаку канамицин-устойчивости, трех сортов табака *Nicotiana tabacum* L. (Вирджин Д, Стамм С2, Хевеши 11) происходит из срезов листовых пластинок, а у двух сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. (Минденеш, Самодий кифли) из дисков микроклубней.

2. Впервые получено 116 линий канамицин-устойчивых регенерантов табака *Nicotiana tabacum* L. сортов Вирджин Д, Стамм С2, Хевеши 11 и 41 линия канамицин-устойчивых регенерантов картофеля *Solanum tuberosum* L. сортов Минденеш и Самодий кифли, свидетельствующих об успешной генетической трансформации растений табака и картофеля PVY^{NTN} -CP геном белка оболочки штамма кольцеобразного некроза клубней Y-вируса картофеля.

3. Методом ПЦР показана интеграция PVY^{NTN} -CP гена в 114 (98%) из 116 независимых линий канамицин-устойчивых регенерантов табака *Nicotiana tabacum* L. и в 39 (95%) из 41 независимых линий канамицин-устойчивых регенерантов картофеля *Solanum tuberosum* L., подтверждающая высокую эффективность генетической конструкции и метода генетической трансформации.

4. Методами нозерн-блоттинг гибридизации и вестерн-блоттинг гибридизации показана экспрессия PVY^{NTN} -CP гена в 89 (78 %) из 114 независимых линиях трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и в 35 (90%) из 39 независимых линий трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L.

5. Установлен полиморфизм трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих ген PVY^{NTN} -CP по признаку вирусоустойчивости и механизму проявления признака, позволивший провести отбор трансгенных линий, обладающих крайней степенью защиты от патогена.

6. Выявлено 5 (4%) из 114 линий трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* L. и 3 (8%) из 39 линий трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих ген PVY^{NTN} -CP, обладающих крайней устойчивостью к двум штаммам ($YBK^{O/C}$ и YBK^{NTN}) Y-вируса картофеля, пригодных для использования в сельскохозяйственном производстве.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Jozsa, R.** Potato Virus Y Coat Protein Gene Induced Resistance in Valuable Potato Cultivars [Text] / R. Jozsa, Z. Stasevski, I. Wolf, S. Horvath, E. Balazs // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. – 2002. - V. 37 (1-2). – P. 1 – 7.
2. **Jozsa, R.** Potato Virus Y High level of field resistance of transgenic tobaccos induced by integrated Potato virus Y coat protein gene [Text] / R. Jozsa, Z. Stasevski, E. Balazs // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. – 2002. – V. 37 (1 – 2). – P. 311 – 316.
3. **Зайнуллин, А.А.** Использование современных методов тестирования Y-вируса картофеля в пробирочных растениях [Текст] / А.А. Зайнуллин, А.С.Зайнуллина, Ф.Ф Замалиева., З.З. Салихова, З. Сташевски, И.В Пикалова.,

- А.В. Богданова, Л.В. Михеева // Вестник защиты растений. – 2002. – №3. – С. 37 – 41.
4. **Замалиева, Ф.Ф.** Система семеноводства картофеля на оздоровленной основе в республике Татарстан [Текст] / Ф.Ф. Замалиева, Г.Ф. Сафиуллина, Р.Р. Назмиева, З. Стасевски, З.З. Салихова // Вестник защиты растений. – 2006. – № 1. – С. 50 – 55.
5. **Zamalieva, F.F.** Potato seed production in middle Volga region [Text] / F.F. Zamalieva, Z. Stasevski, G.F. Safiullina, R.R. Nazmieva, V.B. Karimova, Z.Z. Salikhova, I.V. Pikalova, E.A. Gimaeva, S.G. Vologin, E.A. Prishchepenko, L.A. Garanina, E.F. Davletshina, G.D. Kadyrova // Potato production and innovative technologies /; In: A.J. Haverkort and B.V. Anisimov (eds.). – Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2007. – P. 184 – 193.
6. **Стасевски, З.** Вирусоустойчивость трансгенных растений картофеля *Solanum tuberosum* L., несущих PVY^{NTN}-CP ген белка оболочки Y вируса картофеля [Текст] / З. Стасевски, О.Н. Ильинская // Экологическая генетика. – 2009. – Т. IV – С. 20-33.
7. **Карамова, Н.С.** Мутагенное действие экстрактов растений картофеля *S. tuberosum* L., обработанных пестицидами [Текст] / Н.С. Карамова, З. Стасевски, А.П. Денисова // Ученые записки Казанского университета Сер. Естеств. Науки. – 2009. – Т. 151. кн.1. С. 155-163.
8. **Замалиева, Ф.Ф.** Совершенствование системы семеноводства картофеля на оздоровленной основе [Текст] / Ф.Ф. Замалиева, Г.Ф. Сафиуллина, Р.Р. Назмиева, З. Стасевски, З.З. Салихова // Картофель и овощи. – 2006. – № 2. – С. 16 – 19.
9. **Замалиева, Ф.Ф.** Семеноводство картофеля на оздоровленной основе [Текст] / Ф.Ф. Замалиева, З.З. Салихова З. Стасевски, Г.Ф. Сафиуллина, Р.Р. Назмиева / Защита и карантин растений. – 2007. – №2. – С. 18 – 20.
10. **Стасевски, З.** Неблагоприятные факторы окружающей среды [Текст] / З. Стасевски // Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б.В. Анисимов, Г.Л. Белов, Ю.А. Варицев, С.Н. Еланский [и др.]; под ред. С.Н. Еланского. – Москва : Картофелевод, 2009. – С. 118-129.
11. **Вафин, Р.Р.** Способ защиты ОТ-ПЦР от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил-ДНК-гликозилазы / Р.Р. Вафин, Р.Р. Вафин, Ф.Ф. Замалиева, И.В. Пикалова, З. Стасевски, Т.М. Ахметов, Ш.К. Шакиров, Р.Х. Равилов // Патент РФ на изобретение № 2307167, опубл. 27.09.2007, Бюлл. № 27.
12. **Pikalova, I.V.** Comparison of potatoes cultivars resistance to viruses diseases in Tatarstan growing conditions [Text] / V.A. Osokin, Z. Stashevski, Z.Z. Salikhova, G.R. Mukhametshina, A.A. Zainullin, A.S. Zainullina, G.F. Safiullina, R.R. Nazmijeva, F.F. Zamalijeva // Ecology and Life (International Journal), Novgorod the Great – 2nd Edition. – 2002. - Issue 6. – P.35.
13. **Stasevski, Z.** Analysis of potato virus dispersion in the recovered potato cultivation area [Text] / Z. Stashevski, I.V. Pikalova, V.A. Osokin, Z.Z. Salikhova, G.R. Mukhametshina, A.A. Zainullin, A.S. Zainullina, G.F. Safiullina, R.R. Nazmijeva, F.F. Zamalijeva // Ecology and Life (International Journal), Novgorod the Great. - 2nd Edition. – 2002. – Issue 6. – P. 35.

14. **Stasevski, Z.** Pathogen-derived resistant to potato virus Y induced by integrated virus coat protein in potato *Solanum tuberosum* L. and tobacco *Nicotiana tabacum* L. [Text] / Z. Stasevski, L. Palkovics // Institute of botany annual report. Abstracts of reports presented at the annual conference of the institute of Botany, December 16 – 17, 1998. – P. 27.
15. **Сташевски, З.** Вирусоустойчивые трансгенные растений табака, несущие ген белка оболочки Y-вируса картофеля [Текст] / З. Сташевски Р. Ёшфа, Э. Балаш // Научные материалы первой всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям, Санкт-Петербург, 2002 г. – С. 162 – 163.
16. **Замалиева, Ф.Ф.** Семеноводство картофеля на оздоровленной основе в среднем Поволжье [Текст] Ф.Ф. Замалиева, З.Сташевски, З.З. Салихова, Р.Р. Назмиева, Г.Ф. Сафиуллина / Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков», Минск, 2005 г. – С. 36 – 42.
17. **Сташевски, З.** Вирусоустойчивые трансгенные сорта картофеля, несущие ген белка оболочки Y вируса картофеля [Текст] З. Сташевски, Л. Палкович, Э. Балаш // Материалы XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение», Казань, 4 – 8 апреля 2005 г. – С. 80 – 81.
18. **Вафин, Р.Р.** Разработка техники мультиплексной ОТ-ПЦР на выявление PVY и PVX в системе защиты от контаминации продуктами амплификации на основе разрушающего действия урацил ДНК гликозидаза [Текст] / Р.Р. Вафин, И.И. Пикалова, З. Сташевски, Ф.Ф. Замалиева, О.Г. Зарипов // Материалы XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение», Казань, 4 – 8 апреля 2005 г. – С. 17 – 19.
19. **Вологин, С.Г.** Исследование влияния инсектицидных препаратов на полимеразную цепную реакцию и реакцию обратной транскрипции [Текст] / С.Г. Вологин, И.В. Пикалова, Р.Р. Вафин, З. Сташевски, З.З. Салихова, Э.Ф. Давлетшина, Г.Д. Кадырова, Ф.Ф. Замалиева / Сборник тезисов 10-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых, Пущино, 17-21 апреля 2006 г. – С. 361.
20. **Замалиева, Ф.Ф.** Семеноводство картофеля в Среднем Поволжье [Текст] / Ф.Ф. Замалиева, З. Сташевски, Г.Ф. Сафиуллина, Р.Р. Назмиева, В.Б. Каримова, З.З. Салихова, И.В. Пикалова, Е.А. Гимаева, С.Г. Вологин, Е.А. Прищипенко, Л.А. Гаранина, Э.Ф. Давлетшина, Г.Д. Кадырова // Материалы международного конгресса «Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики», Москва, 2007 г. – С. 91 – 99.
21. **Zamalieva, F.F.** Potato seed production in Tatarstan [Text] / F.F. Zamalieva, Z. Stasevski, G.F. Safiulina, R.R. Nazmieva, Z.Z. Salikhova, I.V. Pikalova, E.A. Gimaeva, S.G. Vologin, E.A., Davletshina, G.D. Kadyrova // Potato for a changing world: 17-th triennial Conference of European Association for Potato Research: abstracts of papers and posters / S.C. Chiru, Gh. Olteanu, C. Aldea, C. Badarau (eds), – Brasov, July 2008. – P. 320 – 323.
22. **Сташевски, З.** Оценка гибридных комбинаций картофеля по устойчивости к YBK [Текст] / З. Сташевски, Е.А. Гимаева, И.В. Пикалова, Н.П. Склорова, //

Картофелеводство: результаты, инновации, практический опыт: Материалы научно-практической конференции и координационного совета «Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства». – Москва, 2008. – Т.1. – С. 456 – 464.

23. **Сташевски, З.** Вирусоустойчивость трансгенных сортов картофеля [Текст] / З. Сташевски, И. Волф, Ш. Хорват, Э. Балаш // Материалы Всеросс. научно-практической конф. молодых ученых «Повышение эффективности растениеводства и животноводства – путь к рентабельному производству», Казань, 6 – 7 февраля 2008 г. – С. 292-299.

24. **Stasevski, Z.** Pathogen-derived transgenic resistance to PVY [Text] / Z. Stasevski // материалы XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им Ю. Либиха, Казань, 5-7 июня 2009 г. – С. 54 – 55.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю проф. О.Н. Ильинской за поддержку и внимательное отношение к работе; проф. Э. Балашу и доктору Л. Палковичу (Центр Сельскохозяйственной Биологии, Гёдёлё, Венгрия) за научно-методическое сопровождение работы; доктору Х. Шандору (Институт селекции картофеля, Кестхей, Венгрия) за техническое сопровождение полевых испытаний; проф. К. Цеминису и доктору Ю. Просцявичюсу (Институт Ботаники, Вильнюс, Литва) за организационно-финансовую поддержку проекта.

Отзывы просим направлять по факсу: (843) 238-76-01 (отд. аспирантуры КГУ, дис. совет Д 212.081.08).